This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646-FR9701412

Dta(en anglais)
D8

Papillomavirus-like particles, fusion proteins and process for producing same

Description

The invention relates to recombinantly produced papillomavirus-like particles, proteins, fusion proteins and processes for formation and cleaning of these particles, proteins and fusion proteins.

Infections with certain ("high-risk") types of genital human papillomaviruses (HPV), e.g. HPV 16, 18 or 45 are regarded as the main risk factor for the development of malignant tumours of the ano-genital tract, of which cervical cancer is by far the most frequent. According to an estimate by the WHO, about half a million new cases of this disease occur around the world every year. The connection between HPV infection and cervical cancer is best investigated on this basis :

a) Precursor lesions of cervical cancer (cervical intraepithelial neoplasia : CIN) are caused by papillomavirus infections.

b) The genomes of certain types of HPV (e.g. 16, 18, 33, 35, 45) are detected in more than 95% of tumour biopsies and in cell lines derived from them. Depending on the geographical origin of the tumours, 50-70% of them contain HPV 16.

c) In all cases investigated since then the open reading frames E6 and E7 are transcribed (Wettstein et al., in Pfister H. (ed) : Papillomaviruses and human cancer, p. 155 to 179, Boca Raton, 1990).

d) The proteins E6 and E7 are detectable in all cervical cancer cell lines and in in vitro transformed human keratinocytes and the majority of cervical cancer patients have E6 or E7-specific antibodies.

26-07-2002

e) The constitutive expression of the E6/E7 proteins is necessary to maintain the transformed state of HPV-positive tumours.

f) The E6 and E7 genes of HPV 16 and HPV 18 are biologically active in the following experimental systems :

- Induction of cellular DNA synthesis in human cells;
- Transformation of human keratinocytes and other cells in culture;
- Tumour formation in transgenic mice.

Other types of HPV (mainly HPV 6 and 11) cause benign genital warts (condylomata acuminata) and are only extremely rarely associated with malignant tumours ("low-risk" types).

Genital human papillomaviruses are usually sexually transmitted and in most cases lead to a persistent infection in the ano-genital mucosa. From this it was concluded that primary infections induce only an insufficient immune response or that the virus has developed possibilities of escaping immune surveillance in the infected cells. On the other hand there are good indications that the immune system is involved in the primary manifestations or in the malignant progression of papillomavirus infections (for an overview see Altmann et al. (1994) in Minson A., Neil J., McCrae M. (eds) : Viruses and Cancer, Cambridge University Press, p. 71 to 80).

a) In animal papillomaviruses (rabbit papillomavirus and bovine papillomavirus) the clinical manifestation of primary infection can be prevented by vaccination with virus structural proteins or with wart extracts ("autologous vaccines").

b) Rodents are protected by vaccination with HPV 16 E6- or E7-positive Vaccinia recombinants or by synthetic peptides from formation of tumours after inoculation of HPV 16 transformed autologous cells.

c) Regression of warts is often systemic and can be induced in the case of animal papillomaviruses by transfer of lymphocytes from "regressor" animals.

d) The frequency of genital warts, CIN and ano-genital cancer is increased in immunosuppressed patients (e.g. after kidney transplant or infected with HIV).

It was concluded from this that papillomavirus-specific vaccinations with the aim of preventing the primary infection and the development of genital cancer should be possible.

1. Prevention of HPV infections by vaccination with the papillomavirus structural proteins L1 and L2 (prophylactic vaccination) is suitable.

As papillomaviruses cannot be multiplied to sufficient titres in cell culture or other experimental systems, the viral proteins can only be produced with the help of recombinant vectors. Recently virus-like particles (VLP) were described which develop after expression of the viral structural proteins L1 and L2 (or L1 alone) in recombinant Vaccinia or Baculovirus. Cleaning of the VLPs is very simple to achieve by means of centrifugation in CsCl or sucrose gradients.

WO 93/02184 describes a method which provides papillomavirus-like particles (VLPs), which are used for diagnostic purposes or as vaccines against infections caused by the papillomavirus.

WO 94/00152 describes an L1 main capsid protein produced by recombination which mimics the conformationally neutralising epitopes on human and animal papilloma virions. These recombinant proteins can be used as vaccines which protect against papillomavirus infections.

2. Treatment of cervical cancer or precursor lesions by immunotherapy using early papillomavirus proteins (essentially E6 or E7) which are expressed in the persistently infected cells (therapeutic vaccination).

It is assumed that this vaccination activates cytotoxic T-cells against persistently infected genital lesions. The target populations are patients with HPV-associated pre-malignant or malignant genital lesions.

Early HPV proteins are produced by expression in E. coli or eukaryotic vectors (e.g. Baculovirus or yeast). However, cleaning is difficult because of the low solubility and usually requires a combination of ion exchange chromatography, gel filtration and affinity chromatography.

It is shown in the PCT application WO 93/20844 that the E7 protein of the papillomavirus from HPV or BPV is therapeutically effective in the regression (but not the prevention) of papillomavirus tumours in mammals. Preferred antigenic protein fragment sequences are also described.

However, to date no VPLs have been described which are suitable for both prophylactic and therapeutic vaccination. The drawback of the last-named processes is that, for example, it is difficult to clean early HPV proteins because of their low solubility.

High particle production would be particularly desirable, especially with regard to a vaccine for prophylactic and therapeutic vaccination.

The drawback of the process described to date is that the production of VLPs was not possible after expression of L1 in E. coli.

The task of the present invention is therefore to provide proteins and VLPs produced by recombination which are suitable as vaccines for prophylactic and therapeutic vaccination, and also processes for producing these proteins and VLPs. Simple cleaning of the recombinant proteins obtained should also be made possible. Production of VLPs after expression of L1 in E. coli should also be made possible.

The present invention solves this task according to the VLPs stated in the independent claims 1 and 12, the proteins stated in the independent claim 36, the fusion proteins stated in the independent claims 8 and 38, the processes stated in claims 42 and 43 and the use according to claims 55 and 56. Further preferred forms, aspects and details of the invention are presented in the dependent patent claims, the description and the preferred embodiments.

According to the present invention VLPs are produced which consist of fusion proteins of late and early HPV proteins (or fragments thereof) ("HVLP") and can be used for prophylactic and therapeutic vaccination. Such a vaccine has the following advantages over conventional products :

a) In the case of prophylactic vaccination, by induction of L1/L2-specific antibodies HVLPs not only prevent the virus from entering the cell but also eliminate cells already infected (by inducing cytotoxic T-cells), if there has already been infection or the humoral immune response was not sufficient.

b) In the case of therapeutic vaccination, HVLPs eliminate persistently infected cells (e.g. in patients with CIN or cervical cancer), and prevent re-infection especially in patients with CIN lesions.

c) Cleaning of HVLPs is as simple as that of VLPs without early HPV proteins.

According to the present invention, VLPs of bovine papillomavirus (BPV) type 1 and human papillomaviruses 11 and 16 can be produced in Vaccinia or Baculovirus after expression of L1 plus L2 or L1 alone. Experiments show that parts of the L1 protein can be deleted (amino acid sequence 311-351, 331-371, 391-431 of BPV 1; 306-315 of HPV 16) without the ability to form VLPs being lost. Such sections exist in the L1 proteins of all papillomaviruses and so the deleted section of L1 can be replaced by other proteins

(from papillomaviruses or another source) and so virus-like hybrid particles can be produced. In the same way, parts of the papillomavirus protein L2 are also deleted and replaced by other (early HPV or other) proteins, and so HVLPs can be formed from the complete L1 protein plus an L2 fusion protein.

Fusion proteins, consisting of deleted L1 or L2 protein of various HPV types (essentially HPV 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45) and the corresponding early proteins E1, E2, E4, E5, E6, E7 (or parts thereof) are produced by expression in Vaccinia recombinants which can be constructed in a very short time. The formation of VLPs, consisting of either an LI fusion protein or the complete L1 protein plus an L2 fusion protein, is checked by electron microscopy and the presence of the early HPV protein is tested by Western Blot analysis using specific antisera. For large-scale production of HPLVs the proteins are expressed in viral or eukaryotic systems, preferably in Baculovirus or yeast.

Corresponding experiments for the production of fusion proteins can be carried out with proteins of a different origin.

Of importance to the present invention are virus-like particles (VLPs) produced by recombination which develop after expression of the viral structural proteins L1 and/or L2, whereby sections of the L1 and/or L2 protein are deleted without losing the ability to form VLPs.

According to the present invention, the deleted section in the L1 protein of the bovine papillomavirus type 1 is preferably the amino acid sequences 311-351, 331-371, 391-431. In the case of L1 proteins of the human papillomavirus 16 it is advantageously the amino acid sequence 306-315.

In a preferred embodiment of the present invention the deleted section of L1 and/or L2 proteins is replaced by other proteins or protein fragments, to give fusion proteins. The proportion of L1 and L2 protein is advantageously about 50 to 99%, preferably about 60 to 90%, particularly preferably about 80%.

However, even if not explicitly stated below, according to the present invention more than one section of the L1 and/or L2 protein should be deleted and preferably replaced by other proteins or protein fragments.

Particularly preferably the deleted section in the L1 or L2 protein is replaced by other proteins of papillomaviruses and/or proteins of other origin, whereby virus-like hybrid particles (HVLPs) can be produced.

It has proved to be particularly advantageous according to the present invention for the VLPs to be formed from an L1 fusion protein or, according to a further embodiment, from a complete L1 protein and an L2 fusion protein.

The fusion proteins, especially for the formation of hybrid virus-like particles according to a further embodiment of the present invention, advantageously consist of a deleted L1 and/or L2 protein of various types of HPV (human papillomavirus), especially preferably HPV 6, 11, 16, 18, 33, 35 and 45, and other proteins or protein fragments. Preferably these other proteins or protein fragments are corresponding early proteins or fragments thereof, such as the early proteins E1, E2, E4, E5, E6 and/or E7.

According to the process according to the invention the fusion proteins and proteins are expressed in viral or eukaryotic vectors, particularly preferably in Baculoviruses or yeasts.

According to a further embodiment of the process according to the invention, the fusion proteins are produced by expression in Vaccinia recombinants.

The use of fusion proteins or the virus-like hybrid particles to produce a prophylactic and therapeutic vaccine is done according to the present invention, preferably after addition of further components.

Previously the L1 open reading frame (ORF) was expressed with the help of eukaryotic vectors, such as Baculovirus, to produce VLPs, such as VLPs from HPV 16. The formation of the VLPs (assembly) takes place in the cell nucleus of the infected cells.

Therefore papillomavirus-like particles produced by recombination which develop after expression of the viral structural proteins L1 and/or L2, in which one or more sections of the L1 and/or L2 protein have been deleted, and the ability to form virus-like particles is greater than that of native formation and/or in vitro production, are of particular importance for the present invention.

According to the present invention at least one of the deleted sections in the L1 and/or L2 protein of a papillomavirus is a deletion, advantageously in the C-terminal amino acid sequence, preferably in a length of about 1 to 34 amino acids (AA), preferably from 1 to 26 amino acids (AA), especially 26 AA.

Advantageously insertion of the C-terminal deletion into the L1 and/or L2 protein increases the production of VLPs several fold, preferably at least 10-fold, and in particular about 10 to 100-fold.

In a preferred embodiment of the present invention the deleted sections in the L1 and/or L2 protein, especially of the bovine papillomavirus, it is 26 C-terminal amino acids. Particularly preferably the 26-AA C-terminal deletion (Gly-Ala-Gly-Cys-Ser-Thr-Val-Arg-Lys-Arg-Arg-Ile-Ser-Gln-Lys-Thr-Ser-Ser-Lys-Pro-Ala-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys) corresponding to the nucleotide position 7016 to 7093 GGGGCAGGAT GTTCAACTGT GAGAAAACGA AGAATTAGCC AAAAAACTTC CAGTAAGCCT GCAAAAAAAA AAAAAAAA is inserted into the L1 ORF of the bovine papillomavirus type 1 (BPV 1). Advantageously insertion of the C-terminal deletion into the L1 and/or L2 protein increases the production of VLPs by at least 10-fold.

According to a further embodiment of the present invention, the at least one deletion in the L1 and/or L2 protein is an homologous amino acid sequence of the human papillomavirus 16 or other papillomaviruses.

According to a further preferred embodiment, the deleted sections in the L1 and/or L2 protein are 34 C-terminal amino acids of the human papillomavirus type 16 (HPV 16), preferably the AA sequence Ala-Gly-Leu-Lys-Ala-Lys-Pro-Lys-Phe-Thr-Leu-Gly-Lys-Arg-Lys-Ala-Thr-Pro-Thr-Thr-Ser-Ser-Thr-Ser-Thr-Thr-Ala-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Leu) corresponding to the nucleotide position 7052 to 7153 GCAGGATTGA AGGCCAAACC AAAATTTACA TTAGGAAAAC GAAAAGCTAC ACCCACCACC TCATCTACCT CTACAACTGC TAAACGCAAA AAACGTAAGC TG, which is inserted into the L1 ORF of the HPV 16.

Particularly preferably the deletion of the L1 and/or L2 protein includes the nuclear localisation signal (NLS). The particle production from the L1 proteins or the L1 proteins and L2 proteins takes place in particular in the cytoplasm. Preferably the particles are secreted into the supernatant, and a secretion of about 5 to 10% of the particles is particularly preferred.

The expression of L1 proteins or L1 proteins and L2 proteins in E. coli takes place according to a further preferred embodiment. 6 histidines are also inserted on the C-terminal deletion in the L1 protein. Advantageously the production of VLPs takes place after expression of L1 proteins or L1 and L2 proteins in E. coli.

According to the present invention the further deleted sections in the L1 protein of the bovine papillomavirus type 1 are preferably the amino acid sequences 311-351, 331-371, 391-431. For L1 proteins of the human papillomavirus 16 it is advantageously the amino acid sequence 306-315.

In a preferred embodiment of the present invention the further deleted section of L1 and/or L2 proteins is replaced by other proteins or protein fragments, giving proteins which are referred to below as fusion proteins. The proportion of L1 and L2 protein is advantageously about 50 to 99%, preferably about 60 to 90%, particularly preferably about 80%.

However, according to the present invention, even if not explicitly mentioned below, more than one further section of the L1 and/or L2 protein should be deleted and preferably replaced by other proteins or protein fragments.

Particularly preferably the deleted section of L1 or L2 protein is replaced by other proteins of papillomaviruses and/or proteins of other origin, whereby virus-like hybrid particles (HVLPs) can be produced.

It has proved to be particularly advantageous according to the present invention that the formation of VLPs takes place from an L1 protein, an L1 fusion protein, an L1 protein and L2 protein, an L1 fusion protein and L2 protein, an L1 protein and L2 fusion protein or an L1 fusion protein and L2 fusion protein.

According to a further embodiment of the present invention at least one of the deleted sections in the L1 and/or L2 protein of a papillomavirus is N-terminal amino acid sequences.

According to the present invention in a further embodiment at least one of the deleted sections in the L1 protein and/or L2 protein of a papillomavirus is amino acid sequences in the middle section of the protein.

Of significance to the invention are also proteins, especially for the formation of papillomavirus-like hybrid particles, where one or more sections of the L1 and/or L2 protein are deleted. In particular, at least one of the deleted sections in the L1 and/or L2 protein is a deletion of a C-terminal amino acid sequence.

The fusion proteins, especially for the formation of papillomavirus-like hybrid particles according to a further embodiment of the present invention, advantageously consist of a deleted L1 and/or L2 protein of various papillomaviruses, particularly preferably HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 and 45, and other proteins or protein fragments of papillomaviruses or of other origin. Preferably these other proteins or protein fragments are corresponding

early papillomavirus proteins or fragments thereof, such as the early proteins E1, E2, E4, E5, E6 and/or E7.

According to the process according to the invention, the expression of the proteins and/or fusion proteins and the production of papillomavirus-like particles are carried out in viral, eukaryotic or prokaryotic vectors, particularly preferably in Vaccinia recombinants, in Baculoviruses, in yeasts or in bacteria, especially E. coli.

The particle production preferably takes place in the cytoplasm. Particularly preferably the particles are secreted into the supernatant, and especially preferably about 5 to 10% of the particles are secreted into the supernatant.

In particular according to the present invention the insertion of a 26-amino acid (AA) C-terminal deletion in the nucleotide position 7016-7093 into the L1 ORF of the bovine papillomavirus type 1 (BPV 1) increases the production of VLPs by more than 10-fold. Thus with the same quantity of L1 protein, as can be demonstrated in a Western Blot test for example, an increase in the particle count can be seen under an electron microscope. As the deletion preferably covers the nuclear localisation signal (NLS), the particle production takes place in the cytoplasm, a considerable portion of the particles is secreted into the supernatant. This is particularly advantageous as this considerably facilitates cleaning.

Proteins, preferably with the said deletion with an additional 6 histidines (His-L1 proteins) are expressed in E. coli according to the present invention. The proteins, especially His-L1 proteins, are preferably cleaned by means of Ni affinity chromatography, whereby at this point, according to an advantageous embodiment, the proteins are present in denaturing buffer, for example 6 M guanidine hydrochloride. Renaturation is carried out for example in 150 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 0.01% Triton-X 100, 10 mM Hepes (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid), pH 7.4.

The production (assembly) of the VLPs is done according to a preferred embodiment of the present invention after dialysis of the proteins, preferably after dialysis against 150

mM NaCl, 25 mM Ca^{2+}, 10% DMSO (dimethyl sulphoxide), 0.1% Triton-X 100, 10 mM Tris [tris-(hydroxymethyl)aminomethane] acetic acid at a pH value of 5.0.

The deletion of sequences in the L1 protein of all papillomaviruses which prevent the early assembly of VLPs leads to a higher yield in VLP production.

Insofar as the L1 NLS is affected in these cases, the assembly takes place in the cytoplasm. Thus according to the invention cleaning of the VLP from the cytoplasm is possible, instead of from the cell nucleus, as before. According to the invention, shorter deletions are also possible. According to the present invention deletions of up to one amino acid and/or substitutions of up to one amino acid are carried out. It proves to be advantageous that with short deletions or with substitutions of up to one or only fewer amino acids, the antigenic properties of the proteins and the VLPs formed therefrom are changed as little as possible compared with the native antigenic properties of the proteins or VLPs.

The introduction of a C-terminal deletion or substitution as described above into L1 and/or L2 fusion proteins also leads to an increase in the production of hybrid VLPs. This should also include the VLPs which only contain L1 fusion proteins and also hybrid VLPs which contain an L1 or L2 fusion protein and an L2 or L1 protein.

For this VLPs are produced which consist of fusion proteins of late and early HPV proteins (or fragments thereof) ("HVLP") and can be used for prophylactic or therapeutic vaccination. Such a vaccine has the following advantages over conventional products :

a) In the case of prophylactic vaccination, by means of induction of L1/L2-specific antibodies HVLPs not only prevent the virus entering the cell but also eliminate cells already infected (by induction of cytotoxic T-cells), if an infection has previously occurred or the humoral immune response was not sufficient.

b) In the case of therapeutic vaccination HVLPs eliminate persistently infected cells (e.g. in patients with CIN or cervical cancer) and above all prevent a re-infection in patients with CIN lesions.

c) The cleaning of the HVLPs is as simple as that of the VLPs without early HPV proteins.

VLPs of the bovine papillomavirus (BPV) type 1 and the human papillomaviruses 11 and 16 can be produced after expression of L1 plus L2 or of L1 alone in Vaccinia and Baculovirus. Experiments show that parts of the L1 protein can be deleted (amino acid sequence 311-351, 331-371, 391-431 of BPV 1; 306-315 of HPV 16), without the ability to form VLPs being lost. Such sections exist in the L1 proteins of all papillomaviruses, and so the deleted section of L1 can be replaced by other proteins (from papillomaviruses or of other origin) and virus-like hybrid particles can be produced. In the same way parts of the papillomavirus protein L2 are also deleted and replaced by other (early HPV or other) proteins, and so HVLPs can also be formed from the complete L1 protein plus an L2 fusion protein.

Fusion proteins consisting of deleted L1 or L2 protein from various HPV types (essentially HPV 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45) and the corresponding early proteins E1, E2, E4, E5, E6, E7 (or parts thereof) are produced by expression in Vaccinia recombinants which can be constructed in a very short time. The formation of VLPs, consisting either of an L1 fusion protein or of the complete L1 protein plus an L2 fusion protein is checked by electron microscopy and the presence of the early HPV protein is tested by Western Blot analysis with the help of specific antisera. For the large-scale production of HVLPs, the expression of the proteins is carried out in viral, eukaryotic or prokaryotic systems, preferably in Baculovirus, in yeast or in E. coli.

The use of the fusion proteins or the virus-like hybrid particles to produce a prophylactic and therapeutic vaccine is done according to the present invention, preferably after addition of further components.

Corresponding experiments to produce fusion proteins can be carried out with proteins of different origin.

Patent claims

1. Recombinantly produced papillomavirus-like particles which occur after expression of the viral structural proteins L1 and/or L2, characterised in that one or more sections of the L1 and/or L2 protein are deleted, with the ability to form virus-like particles being retained.

2. Virus-like particles according to claim 1, characterised in that the deleted sections in the L1 protein are the amino acid sequences 311-351, 331-371, 391-431 of bovine papillomavirus type 1.

3. Virus-like particles according to claim 1, characterised in that the deleted sections in the L1 protein are the amino acid sequence 306-315 of the human papillomavirus 16.

4. Virus-like particles according to one of the above claims, characterised in that the deleted section of L1 and/or L2 proteins is replaced by other proteins or protein fragments to give a fusion protein.

5. Virus-like particles according to claim 4, characterised in that the proportion of L1 and L2 protein is about 50 to 99%, preferably about 60 to 90%, especially preferably about 80% of the fusion protein.

6. Virus-like particles according to claim 4 and 5, characterised in that the deleted section in the L1 or L2 protein is replaced by other proteins from papillomaviruses and/or proteins of other origin, whereby virus-like hybrid particles can be produced.

7. Virus-like particles according to one of the above claims, characterised in that the formation of the virus-like particles is carried out from an L1 fusion protein or a complete L1 protein and an L2 fusion protein.

8. Fusion proteins, especially for the formation of papillomavirus-like hybrid particles according to one of claims 4 to 7, characterised in that the fusion proteins from a deleted L1 and/or L2 protein from various HPV types include other proteins or fragments thereof.

9. Fusion proteins according to claim 8, characterised in that the other proteins or fragments are early proteins or fragments.

10. Fusion protein according to claim 8 and 9, characterised in that it relates to the early proteins E1, E2, E4, E5, E6, E7 or fragments thereof.

11. Fusion protein according to one of claims 8 to 10, characterised in that it relates to deleted L1 and/or L2 proteins of various HPV types such as HPV 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45.

12. Recombinantly produced papillomavirus-like particles which occur after expression of the viral structural proteins L1 and/or L2, characterised in that one or more sections of the L1 and/or L2 proteins are deleted, and the ability to form virus-like particles is increased compared with native production and/or in vitro production.

13. Virus-like particles according to claim 12, characterised in that at least one of the deleted sections in the L1 and/or L2 protein of a papillomavirus is C-terminal amino acid sequences.

14. Virus-like particles according to claim 13, characterised in that the at least one deleted section in the C-terminal region in the L1 and/or L2 protein is an amino acid sequence with a length of about 1 to 34 amino acids, preferably 1 to 26 amino acids, of a papillomavirus.

15. Virus-like particles according to one of claims 12 to 14, characterised in that after insertion in particular of the C-terminal deletion into the L1 and/or L2 protein the

production of VLPs is increased several fold, preferably by at least 10 fold, especially preferably by about 10-100 fold.

16. Virus-like particles according to one of claims 12 to 15, characterised in that the deleted sections in the L1 and/or L2 protein are 26 C-terminal amino acids of the bovine papillomavirus.

17. Virus-like particles according to claim 16, characterised in that the 26-AA C-terminal deletion (Gly-Ala-Gly-Cys-Ser-Thr-Val-Arg-Lys-Arg-Arg-Ile-Ser-Gln-Lys-Thr-Ser-Ser-Lys-Pro-Ala-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys) corresponding to the nucleotide position 7016 to 7093 GGGGCAGGAT GTTCAACTGT GAGAAAACGA AGAATTAGCC AAAAAACTTC CAGTAAGCCT GCAAAAAAAA AAAAAAAA is inserted into the L1 ORF of the bovine papillomavirus type 1 (BPV 1).

18. Virus-like particles according to one of claims 12 to 15, characterised in that the deleted sections in the L1 and/or L2 protein are 34 C-terminal amino acids of the human papillomavirus type 16 (HPV 16).

19. Virus-like particles according to claim 18 characterised in that the 34-AA C-terminal deletion (Ala-Gly-Leu-Lys-Ala-Lys-Pro-Lys-Phe-Thr-Leu-Gly-Lys-Arg-Lys-Ala-Thr-Pro-Thr-Thr-Ser-Ser-Thr-Ser-Thr-Thr-Ala-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Leu) corresponding to the nucleotide position 7052 to 7153 GCAGGATTGA AGGCCAAACC AAAATTTACA TTAGGAAAAC GAAAAGCTAC ACCCACCACC TCATCTACCT CTACAACTGC TAAACGCAAA AAACGTAAGC TG is inserted into the L1 ORF of the human papillomavirus type 16 (HPV 16).

20. Virus-like particles according to one of claims 13 to 15, characterised in that the at least one deletion in the C-terminal region in the L1 and/or L2 protein is an homologous amino acid sequence of the human papillomavirus 16 or other papillomaviruses.

21. Virus-like particles according to one of claims 12 to 20, characterised in that the deletion of the L1 and/or L2 protein covers the nuclear localisation signal (NLS).

22. Virus-like particles according to one of claims 12 to 21, characterised in that the particle production is carried out from the L1 proteins or L1 and L2 proteins in the cytoplasm.

23. Virus-like particles according to one of claims 12 to 22, characterised in that particles are secreted in the supernatant.

24. Virus-like particles according to claim 23, characterised in that about 5 to 10% of the particles are secreted in the supernatant.

25. Virus-like particles according to one of claims 12 to 24, characterised in that the expression of L1 proteins or L1 and L2 proteins takes place in E. coli.

26. Virus-like particles according to claim 25, characterised in that 6 histidines were inserted at the C-terminal deletion in the L1 protein.

27. Virus-like particles according to one of claims 25 to 26 characterised in that the production of VLPs is carried out after expression of L1 proteins or L1 and L2 proteins in E. coli.

28. Virus-like particles according to one of claims 12 to 27, characterised in that the further deleted sections in the L1 protein are the amino acid sequences 311-351, 331-371, 391-431 of the bovine papillomavirus type 1.

29. Virus-like particles according to claim 27, characterised in that the further deleted sections in the L1 protein are the amino acid sequence 306-315 of the human papillomavirus 16.

30. Virus-like particles according to one of claims 12 to 29, characterised in that the deleted section of L1 and/or L2 proteins is replaced by other proteins or protein fragments to give a fusion protein.

31. Virus-like particles according to claim 30, characterised in that the proportion of L1 or L2 protein is about 50 to 99%, preferably about 60 to 90%, especially preferably about 80% of the fusion protein.

32. Virus-like particles according to claim 30 and 31, characterised in that the deleted section in the L1 or L2 protein is replaced by other proteins from papillomaviruses and/or proteins of other origin, whereby virus-like hybrid particles can be produced.

33. Virus-like particles according to one of claims 12 to 32, characterised in that the formation of the virus-like particles is carried out from an L1 protein, an L1 fusion protein, and L1 protein and L2 protein, an L1 fusion protein and L2 protein, an L1 protein and L2 fusion protein or an L1 fusion protein and an L2 fusion protein.

34. Virus-like particles according to one of claims 12 to 33, characterised in that at least one of the deleted section in the L1 and/or L2 protein of a papillomavirus is N-terminal amino acid sequences.

35. Virus-like particles according to one of claims 12 to 34, characterised in that at least one of the deleted sections in the L1 and/or L2 protein of a papillomavirus is amino acid sequences in the middle region of the protein.

36. Proteins, especially for the formation of papillomavirus-like hybrid particles according to one of claims 12 to 35, characterised in that one or more sections of the L1 and/or L2 protein are deleted.

37. Proteins according to claim 36, characterised in that at least one of the deleted sections in the L1 and/or L2 protein is a deletion of a C-terminal amino acid sequence.

38. Fusion proteins, especially for the formation of papillomavirus-like hybrid particles according to one of claims 12 to 37, characterised in that the fusion proteins contain deleted L1 and/or L2 proteins from various papillomaviruses and other proteins or fragments of papillomaviruses or of other origin.

39. Fusion protein according to claim 38, characterised in that the other proteins or fragments are early papillomavirus proteins or fragments thereof.

40. Fusion protein according to claim 38 or 39, characterised in that it relates to the early proteins E1, E2, E4, E5, E6, E7 or fragments thereof.

41. Fusion protein according to one of claims 38 to 40, characterised in that it relates to deleted L1 and/or L2 proteins of various HPV types such as HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 45.

42. Process for the expression of the fusion proteins according to one of claims 8 to 11, characterised in that the expression of the proteins and fusion proteins is carried out in viral or eukaryotic vectors.

43. Process for the expression of the proteins and/or fusion proteins and production of papillomavirus-like particles according to one of claims 12 to 35, characterised in that the expression of the proteins and fusion proteins is carried out in viral, eukaryotic or prokaryotic vectors.

44. Process according to one of claims 42 or 43, characterised in that the proteins or fusion proteins are produced by expression in Vaccinia recombinants.

45. Process according to one of claims 42 or 43, characterised in that the expression of the proteins and fusion proteins is carried out in Baculoviruses or yeasts.

46. Process according to claim 43, characterised in that the expression of the proteins and fusion proteins is carried out in E. coli.

47. Process according to claim 46, characterised in that the cleaning, especially of the L1 proteins, is carried out by Ni affinity chromatography and renaturation, preferably in 150 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 0.01% Triton-X 100, 10 mM Hepes pH 7.4.

48. Process according to claim 47, characterised in that the proteins are present in denaturing buffer at the time of cleaning.

49. Process according to claim 48, characterised in that the denaturing buffer is 6 M guanidine hydrochloride.

50. Process according to one of claims 43 to 49, characterised in that the assembly of the VLPs takes place after dialysis.

51. Process according to claim 50, characterised in that the dialysis is carried out against 150 mM NaCl, 25 mM Ca^{2+}, 10% DMSO, 0.1% Triton-X 100 and 10 mM Tris acetic acid at pH = 5.0.

52. Process according to one of claims 43 to 51, characterised in that the particle production takes place in the cytoplasm.

53. Process according to one of claims 43 to 52, characterised in that particles are secreted into the supernatant.

54. Process according to claim 53, characterised in that about 5 to 10% of the particles are secreted into the supernatant.

55. Use of the proteins and/or fusion proteins according to one of claims 8 to 11 or 36 to 41 to produce a vaccine for prophylactic and/or therapeutic vaccination, preferably after addition of further components.

56. Use of the virus-like hydrid particles according to one of claims 1 to 7 or 12 to 35 for the production of a vaccine for prophylactic and/or therapeutic vaccination, preferably after addition of further components.

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646-FR9701412
D7 (en allemand)

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 15/37, 15/62, C07K 14/025, A61K 39/12 — A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/11272

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. April 1996 (18.04.96)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/03974

(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Oktober 1995 (09.10.95)

(30) Prioritätsdaten:
P 44 35 907.1 7. Oktober 1994 (07.10.94) DE
195 26 752.4 21. Juli 1995 (21.07.95) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten ausser US*): MEDIGENE GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK, THERAPHIE UND TECHNOLOGIE MBH [DE/DE]; Lochhamer Strasse 11, D-82152 Martinsried (DE).

(71)(72) Anmelder und Erfinder: GISSMANN, Lutz [DE/US]; 6340 Americana Drive No. 1201, Willowbrook, IL 60514 (US). ZHOU, Jian [AU/US]; 5931 Stewart Drive No. 1021, Willowbrook, IL 60514 (US). MÜLLER, Martin [DE/US]; 1351 North Hoyne, Chicago, IL 60622 (US). PAINSTIL, Jeanette [GH/US]; 1441 Evers Avenue, Westchester, IL 60154 (US).

(74) Anwälte: DIEHL, Hermann, O., Th. usw.; Flüggenstrasse 13, D-80639 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: PAPILLOMA VIRUS-LIKE PARTICLES, FUSION PROTEINS AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) Bezeichnung: PAPILLOMAVIRUSÄHNLICHE PARTIKEL, FUSIONSPROTEINE SOWIE VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG

(57) Abstract

Recombinant papilloma virus-like particles result from the expression of viral structural proteins L1 and/or L2 in which one or several sections of the L1 and/or L2 protein are deleted. The ability to form virus-like particles is at least the same as, preferably higher than, that of native reproduction and/or *in vitro* production processes.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft rekombinant hergestellte papillomavirusähnliche Partikel, die nach Expression der viralen Strukturproteine L1 und/oder L2 entstehen, in denen ein oder mehrere Abschnitte des L1- und/oder L2-Proteins deletiert sind und wobei die Fähigkeit zur Bildung von virusähnlichen Partikeln im Vergleich zur nativen Bildung und/oder *in vitro* Produktion zumindest bestehen bleibt, bevorzugt erhöht ist.

26-07-2002

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Printed:30-07-2002 EDOC - 97935646 FR9701412

Papillomavirusähnliche Partikel, Fusionsproteine sowie Verfahren zu deren Herstellung

Beschreibung

Die Erfindung betrifft rekombinant hergestellte papillomavirusähnliche Partikel, Proteine, Fusionsproteine sowie Verfahren zur Bildung und Reinigung dieser Partikel, Proteine und Fusionsproteine.

Infektionen mit bestimmten ("high-risk") Typen von genitalen Papillomaviren des Menschen (HPV), z.B. HPV 16, 18 oder 45 gelten als hauptsächlicher Risikofaktor für die Entstehung von bösartigen Tumoren des Anogenitaltrakts, von denen Gebärmutterhalskrebs (Cervixcarcinom) mit Abstand am häufigsten ist. Nach einer Schätzung der WHO treten jährlich weltweit etwa eine halbe Million neuer Fälle dieser Erkrankung auf. Aufgrund dieser Häufung ist der Zusammenhang zwischen HPV-Infektion und Cervixcarcinom am besten untersucht:

a) Vorläuferläsionen vom Cervixcarcinom (cervikale intraepitheliale Neoplasie: CIN) werden durch Papillomavirus-Infektion verursacht.

b) Die Genome bestimmter HPV-Typen (z.B. 16,18,33,35,45) werden in mehr als 95 % der Tumorbiopsien sowie in davon abgeleiteten Zellinien nachgewiesen. Abhängig vom geographischen Ursprung der Tumore enthalten 50 - 70 % davon HPV 16.

c) In allen daraufhin untersuchten Fällen werden die offenen Leseraster E6 und E7 transkribiert (Wettstein et al., in Pfister H. (ed): Papillomaviruses and human cancer, S. 155 bis 179, Boca Raton, 1990).

d) Die Proteine E6 und E7 sind in allen Cervixcarcinom-Zellinien sowie in *in vitro* transformierten menschlichen Keratinozyten nachweisbar und die Mehrzahl der

26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646-FR970141 2

Cervixcarcinom-Patientinnen haben E6- bzw. E7-spezifische Antikörper.

e) Die konstitutive Expression der E6/E7-Proteine ist notwendig zur Aufrechterhaltung des transformierten Zustandes HPV-positiver Tumore.

f) Die E6- und E7-Gene von HPV 16 und HPV 18 sind biologisch in folgenden experimentellen Systemen aktiv:

- Induktion von zellulärer DNA Synthese in menschlichen Zellen;
- Transformation von menschlichen Keratinozyten und anderen Zellen in Kultur;
- Tumorbildung in transgenen Mäusen.

Andere HPV-Typen (in erster Linie HPV 6 und 11) verursachen gutartige Genitalwarzen (condylomata acuminata) und sind nur extrem selten mit bösartigen Tumoren assoziiert ("low-risk" Typen).

Genitale Papillomaviren des Menschen werden in der Regel durch Geschlechtsverkehr übertragen und führen in den meisten Fällen zu einer persistierenden Infektion in der Anogenital-Schleimhaut. Daraus wurde geschlossen, daß Primärinfektionen nur eine ungenügende Immunantwort induzieren oder daß das Virus Möglichkeiten entwickelt hat, in den infizierten Zellen der Immunüberwachung zu entkommen. Auf der anderen Seite gibt es gute Hinweise darauf, daß das Immunsystem bei der Primärmanifestation bzw. bei der malignen Progression von Papillomavirus-Infektionen beteiligt ist (zur Übersicht siehe Altmann et al. (1994) in Minson A., Neil J., McCrae M. (eds): Viruses and Cancer, Cambridge University Press, S. 71 bis 80).

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646-FR9701412

a) Bei animalen Papillomaviren (Kaninchen-Papillomavirus und Rinder-Papillomavirus) läßt sich die klinische Manifestation von Primärinfektionen durch Vakzinierung mit Virus-Strukturproteinen oder mit Warzenextrakten ("autologe Vakzine") verhindern.

b) Nager werden durch Impfung mit HPV 16 E6- oder E7-positiven Vaccinia-Rekombinanten bzw. durch synthetische Peptide vor der Tumorbildung nach Inokulation HPV 16 transformierter autologer Zellen geschützt.

c) Regression von Warzen ist oftmals systemisch und läßt sich bei animalen Papillomaviren durch Transfer von Lymphozyten von "Regressor"-Tieren induzieren.

d) Die Häufigkeit von Genitalwarzen, CIN und Anogenitalkrebs ist bei immunsupprimierten Patienten (z.B. Nierentransplantierten oder HIV-Infizierten) erhöht.

Daraus wurde geschlossen, daß Papillomavirus-spezifische Impfungen mit dem Ziel der Verhinderung der Primärinfektion und der Entstehung von Genitalkrebs möglich sein sollten.

1. Geeignet ist die Verhinderung von HPV-Infektionen durch Impfung mit den Papillomavirus-Strukturproteinen L1 und L2 (prophylaktische Impfung).

   Da sich Papillomaviren nicht in Zellkultur oder anderen experimentellen Systemen zu ausreichenden Titern vermehren lassen, können die viralen Proteine nur mit Hilfe rekombinanter Vektoren hergestellt werden. Kürzlich wurden virusähnliche Partikel (VLP), die nach Expression der viralen Strukturproteine L1 und L2 (bzw. L1 allein) in rekombinanten Vakzinia oder Baculovirus entstehen, beschrieben. Die Reinigung der VLP´s ist sehr einfach

5 26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646:FR9701412

mittels Zentrifugation in CsCl- oder Sucrosegradienten durchführbar.

WO 93/02184 beschreibt eine Methode, die "Papilloma virus like particles" (VLP´s, Papillomavirus-ähnliche Partikel) zur Verfügung stellt, die für diagnostische Verwendungen oder als Vaccine gegen durch den Papillomavirus verursachte Infektionen genutzt werden.

WO 94/00152 beschreibt ein rekombinant produziertes L1-Haupt-Capsid-Protein, welches die konformational neutralisierenden Epitope auf humanen und tierischen Papilloma-Virionen nachahmt (mimics). Diese rekombinanten Proteine sind als Vaccine, die gegen Papillomavirus-Infektionen schützen, einsetzbar.

2. Behandlung von Cervixcarcinomen oder Vorläuferläsionen durch Immuntherapie mit Hilfe von frühen Papillomavirus-Proteinen (in erster Linie E6 bzw. E7), die in den persistent infizierten Zellen exprimiert werden (therapeutische Impfung).

Es wird angenommen, daß durch diese Impfung zytotoxische T-Zellen gegen persistent infizierte Genitalläsionen aktiviert werden. Zielpopulation sind Patienten mit HPV-assoziierten prämalignen oder malignen Genitalläsionen.

Frühe HPV-Proteine werden durch Expression in E. coli oder eukaryontischen Vektoren (z.B. Baculovirus oder Hefe) hergestellt. Die Reinigung wird jedoch durch die geringe Löslichkeit erschwert und bedarf in der Regel einer Kombination von Ionenaustausch-Chromatographie, Gelfiltration und Affinitätschromatographie.

In der PCT-Anmeldung WO 93/20844 wird dargelegt, daß das E7-Protein des Papillomavirus aus HPV oder BPV

6 26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646-FR9701412

therapeutisch effektiv in der Regression (jedoch nicht in der Prävention) von Papillomavirus-Tumoren in Säugern ist. Weiterhin werden auch bevorzugte antigene Protein-Fragment-Sequenzen beschrieben.

Bisher wurden jedoch keine VPL´s beschrieben, die sich sowohl für die prophylaktische als auch die therapeutische Impfung eignen. Nachteilig ist bei den zuletzt genannten Verfahren, daß z.B. frühe HPV-Proteine aufgrund ihrer geringen Löslichkeit nur erschwert gereinigt werden können.

Besonders wünschenswert, insbesondere im Hinblick auf einen Impfstoff für die prophylaktische und therapeutische Impfung wäre eine hohe Partikelproduktion.

Nachteilig war an dem bisher beschriebenen Verfahren, daß die Herstellung von VLPs nach Expression von L1 in E. coli nicht möglich war.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, rekombinant hergestellte Proteine sowie VLP´s zur Verfügung zu stellen, die sich als Impfstoff zur prophylaktischen und therapeutischen Impfung eignen, sowie Verfahren zur Herstellung dieser Proteine und VLP´s. Ebenso soll eine einfache Reinigung der erhaltenen rekombinanten Proteine ermöglicht sein. Auch sollte eine Herstellung von VLPs nach Expression von L1 in E. coli ermöglicht sein.

Die vorliegende Erfindung löst diese Aufgabe gemäß den in den unabhängigen Ansprüchen 1 und 12 angegebenen VLPs, den im unabhängigen Anspruch 36 angegebenen Proteinen, den in den unabhängigen Ansprüchen 8 und 38 angegebenen Fusionsproteinen, den in den Ansprüchen 42 und 43 angegebenen Verfahren, und der Verwendung nach den

26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646-FR970412

Ansprüchen 55 und 56. Weitere bevorzugte Ausgestaltungen, Aspekte und Details der Erfindung sind in den abhängigen Patentansprüchen der Beschreibung sowie den bevorzugten Ausführungsformen dargelegt.

Gemäß der vorliegenden Erfindung werden VLP´s hergestellt, die aus Fusionsproteinen von späten und frühen HPV-Proteinen (oder Fragmenten davon) ("HVLP") bestehen und für prophylaktische bzw. therapeutische Impfung einsetzbar sind. Ein solcher Impfstoff besitzt gegenüber konventionellen Präparaten die im folgenden beschriebenen Vorteile:

a) Im Falle von prophylaktischer Impfung verhindern HVLP´s durch Induktion L1/L2-spezifischer Antikörper nicht nur den Eintritt des Virus in die Zelle, sondern eliminieren bereits infizierte Zellen (durch Induktion von zytotoxischen T-Zellen), falls schon früher eine Infektion stattgefunden hat oder die humorale Immunantwort nicht ausreichend war.

b) Im Falle von therapeutischer Impfung eliminieren HVLP´s persistent infizierte Zellen (z.B. bei Patienten mit CIN oder Cervixcarcinom), und verhindern vor allem bei Patientinnen mit CIN-Läsionen eine Reinfektion.

c) Die Reinigung der HVLP´s ist ähnlich einfach wie die der VLP´s ohne frühe HPV-Proteine.

Gemäß der vorliegenden Erfindung können VLP´s des Bovinen Papillomavirus (BPV) Typ 1 und der humanen Papillomaviren 11 und 16 nach Expression von L1 plus L2 bzw. von L1 allein in Vaccinia oder Baculovirus hergestellt werden. Experimente zeigen, daß Teile des L1-Proteins deletiert werden können (Aminosäuresequenz 311-351, 331-371, 391-431 von BPV 1; 306-

8 26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646:FR9701412

315 von HPV 16), ohne daß die Fähigkeit zur Bildung von VLP´s verloren geht. Solche Bereiche existieren in den L1-Proteinen aller Papillomaviren, so daß der deletierte Bereich von L1 durch andere Proteine (von Papillomaviren oder von anderem Ursprung) ersetzt werden kann und daß so virusähnliche Hybridpartikel hergestellt werden können. In gleicher Weise werden auch Teile des Papillomavirus-Proteins L2 deletiert und durch andere (frühe HPV oder sonstige) Proteine ersetzt, daß also HVLP´s auch aus dem vollständigen L1-Protein plus einem L2-Fusionsprotein gebildet werden können.

Fusionsproteine, bestehend aus deletiertem L1- oder L2-Protein von verschiedenen HPV-Typen (in erster Linie HPV 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45) und den entsprechenden frühen Proteinen E1, E2, E4, E5, E6, E7 (oder Teilen davon) werden durch Expression in Vaccinia-Rekombinanten hergestellt, die in sehr kurzer Zeit konstruiert werden können. Die Bildung von VLP´s, bestehend entweder aus einem L1-Fusionsprotein oder aus dem vollständigen L1-Protein plus einem L2-Fusionsprotein, wird durch Elektronenmikroskopie überprüft und das Vorhandensein des frühen HPV-Proteins durch Western Blot Analyse mit Hilfe spezifischer Antiseren getestet. Für die Produktion von HPLV´s im großen Maßstab wird die Expression der Proteine in viralen oder eukaryotischen Systemen, bevorzugt in Baculovirus oder in Hefe, durchgeführt.

Entsprechende Experimente zur Herstellung von Fusionsproteinen können mit Proteinen anderen Ursprungs durchgeführt werden.

Wesentlich für die vorliegende Erfindung sind rekombinant hergestellte, virusähnliche Partikel (virus like particles, VLP´s), die nach Expression der viralen Strukturproteine L1 und/oder L2 entstehen, wobei Abschnitte des L1- und/oder L2-

9 26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646-FR9701412

Proteins deletiert sind, ohne daß die Fähigkeit zur Bildung von VLP´s verlorengeht.

Gemäß der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei dem deletierten Bereich im L1-Protein des Bovinen Papillomavirus Typ 1 bevorzugt um die Aminosäuresequenzen 311-351, 331-371, 391-431. Bei L1-Proteinen des humanen Papillomavirus 16 handelt es sich vorteilhafterweise um die Aminosäuresequenz 306-315.

In einer bevorzugten Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung wird der deletierte Bereich von L1- und/oder L2-Proteinen durch andere Proteine oder Proteinfragmente ersetzt, wobei Fusionsproteine erhalten werden. Der Anteil an L1- bzw. L2-Protein beträgt vorteilhafterweise ca. 50 bis 99 %, bevorzugt ca. 60 bis 90 %, besonders bevorzugt ca. 80 %.

Gemäß der vorliegenden Erfindung sollen jedoch, wenn auch im weiteren nicht explizit erwähnt, auch mehr als ein Bereich, des L1- und/oder L2-Proteins deletiert und bevorzugt durch andere Proteine oder Proteinfragmente ersetzt werden.

Besonders bevorzugt wird der deletierte Bereich im L1- oder L2-Protein durch andere Proteine von Papillomaviren und/oder Proteine anderen Ursprungs ersetzt, wodurch virusähnliche Hybridpartikel (HVLP´s) herstellbar sind.

Es hat sich als besonders vorteilhaft gemäß der vorliegenden Erfindung erwiesen, daß die Bildung der VLP´s aus einem L1-Fusionsprotein oder, gemäß einer weiteren Ausführungsform, aus einem vollständigen L1-Protein und einem L2-Fusionsprotein erfolgt.

Die Fusionsproteine, insbesondere zur Bildung von virusähnlichen Hybridpartikeln gemäß einer weiteren Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung, bestehen

10 26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646-FR9701412

vorteilhafterweise aus einem deletierten L1- und/oder L2-Protein von verschiedenen HPV-Typen (human papilloma virus), besonders bevorzugt HPV 6, 11, 16, 18, 33, 35 und 45, und anderen Proteinen oder Proteinfragmenten. Bevorzugt handelt es sich bei diesen anderen Proteinen oder Proteinfragmenten um entsprechende frühe Proteine oder Fragmente davon, wie z.B. die frühen Proteine E1, E2, E4, E5, E6 und/oder E7.

Gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Expression der Fusionsproteine und Proteine in viralen oder eukaryotischen Vektoren, ganz besonders bevorzugt in Baculoviren oder in Hefen, durchgeführt.

Gemäß einer weiteren Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Fusionsproteine durch Expression in Vaccinia-Rekombinanten hergestellt.

Die Anwendung der Fusionsproteine oder der virusähnlichen Hybridpartikel zur Herstellung eines prophylaktischen und therapeutischen Impfstoffes erfolgt gemäß der vorliegenden Erfindung bevorzugt nach Zugabe weiterer Komponenten.

Bislang wurde zur Herstellung von VLPs, wie z.B. von VLPs aus HPV 16, das L1 offene Leseraster (ORF) mit Hilfe eukaryontischer Vektoren, wie z.B. Bakulovirus, exprimiert. Die Bildung der VLPs (Assembly) erfolgt im Zellkern der infizierten Zellen.

Wesentlich für die vorliegende Erfindung sind deshalb insbesondere rekombinant hergestellte, papillomavirusähnliche Partikel, die nach Expression der viralen Strukturproteine L1 und/oder L2 entstehen, in denen ein oder mehrere Abschnitte des L1- und/oder L2-Proteins deletiert sind, wobei die Fähigkeit zur Bildung von virusähnlichen Partikeln im Vergleich zur nativen Bildung und/oder *in vitro* Produktion erhöht ist.

11 26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646-FR970412

Gemäß der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei mindestens einem der deletierten Bereiche im L1- und/oder L2-Protein eines Papillomavirus um eine Deletion, vorteilhafterweise in der C-terminalen Aminosäuresequenz, bevorzugt in einer Länge von ungefähr 1 bis 34 Aminosäuren (AS), bevorzugt von 1 bis 26 Aminosäuren (AS), insbesondere von 26 AS.

Vorteilhafterweise wird nach Einfügen der C-terminalen Deletion in das L1- und/oder L2-Protein die Produktion von VLPs um ein Vielfaches erhöht, bevorzugt um das mindestens 10-fache, und insbesondere um das ungefähr 10- bis 100-fache.

In einer bevorzugten Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den deletierten Bereichen im L1- und/oder L2-Protein, insbesondere des Bovinen Papillomavirus, um 26 C-terminale Aminosäuren. Besonders bevorzugt ist die 26 AS große, C-terminale Deletion (Gly-Ala-Gly-Cys-Ser-Thr-Val-Arg-Lys-Arg-Arg-Ile-Ser-Gln-Lys-Thr-Ser-Ser-Lys-Pro-Ala-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys) entsprechend der Nucleotid-Position 7016 bis 7093 GGGGCAGGAT GTTCAACTGT GAGAAAACGA AGAATTAGCC AAAAAACTTC CAGTAAGCCT GCAAAAAAAA AAAAAAAA in das L1 ORF des Bovinen Papillomavirus Typ 1 (BPV 1) eingefügt. Vorteilhafterweise ist nach Einfügen der C-terminalen Deletion in das L1- und/oder L2-Protein die Produktion von VLP´s um das mindestens 10-fache gesteigert.

Gemäß einer weiteren Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der mindestens einen Deletion im L1- und/oder L2-Protein um eine homologe Aminosäuresequenz des humanen Papillomavirus 16 oder anderer Papillomaviren.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung handelt es sich bei den deletierten Bereichen im L1- und/oder L2-Protein um 34 C-terminale Aminosäuren des Humanen Papillomavirus

12 26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646-FR970412

Typ 16 (HPV 16), bevorzugt um die AS-Sequenz Ala-Gly-Leu-Lys-Ala-Lys-Pro-Lys-Phe-Thr-Leu-Gly-Lys-Arg-Lys-Ala-Thr-Pro-Thr-Thr-Ser-Ser-Thr-Ser-Thr-Thr-Ala-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Leu) entsprechend der Nucleotid-Position 7052 bis 7153 GCAGGATTGA AGGCCAAACC AAAATTTACA TTAGGAAAAC GAAAAGCTAC ACCCACCACC TCATCTACCT CTACAACTGC TAAACGCAAA AAACGTAAGC TG, welche in das L1 ORF des HPV 16 eingefügt ist.

Besonders bevorzugt umfaßt die Deletion des L1- und/oder L2-Proteins das nukleäre Lokalisationssignal (NLS). Die Partikelproduktion aus den L1-Proteinen oder den L1-Proteinen und L2-Proteinen erfolgt insbesondere im Zytoplasma. Bevorzugt werden die Partikel in den Überstand sezerniert, besonders bevorzugt ist eine Sekretion von ungefähr 5 bis 10 % der Partikel.

Die Expression von L1-Proteinen oder L1-Proteinen und L2-Proteinen in E. coli erfolgt gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform. Hierbei sind an der C-terminalen Deletion im L1-Protein insbesondere zusätzlich 6 Histidine eingefügt. Vorteilhafterweise erfolgt die Herstellung von VLP´s nach Expression von L1-Proteinen oder L1- und L2-Proteinen in E. coli.

Gemäß der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den weiteren deletierten Bereichen im L1-Protein des Bovinen Papillomavirus Typ 1 bevorzugt um die Aminosäuresequenzen 311-351, 331-371, 391-431. Bei L1-Proteinen des humanen Papillomavirus 16 handelt es sich vorteilhafterweise um die Aminosäuresequenz 306-315.

In einer bevorzugten Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung wird der weitere deletierte Bereich von L1- und/oder L2-Proteinen durch andere Proteine oder Proteinfragmente ersetzt, wobei Proteine erhalten werden, die im weiteren als Fusionsproteine bezeichnet werden. Der Anteil an L1- bzw. L2-

26-07-2002

Printed:30-07-2002 EDOC 97935646:FR9701412

Protein beträgt vorteilhafterweise ca. 50 bis 99 %, bevorzugt ca. 60 bis 90 %, besonders bevorzugt ca. 80 %.

Gemäß der vorliegenden Erfindung sollen jedoch, wenn auch im weiteren nicht explizit erwähnt, auch mehr als ein weiterer Bereich des L1- und/oder L2-Proteins deletiert und bevorzugt durch andere Proteine oder Proteinfragmente ersetzt werden.

Besonders bevorzugt wird der deletierte Bereich von L1- oder L2-Protein durch andere Proteine von Papillomaviren und/oder Proteine anderen Ursprungs ersetzt, wodurch virusähnliche Hybridpartikel (HVLP´s) herstellbar sind.

Es hat sich als besonders vorteilhaft gemäß der vorliegenden Erfindung erwiesen, daß die Bildung der VLP´s aus einem L1-Protein, einem L1-Fusionsprotein, einem L1-Protein und L2-Protein, einem L1-Fusionsprotein und L2-Protein, einem L1-Protein und einem L2-Fusionsprotein oder einem L1-Fusionsprotein und einem L2-Fusionsprotein erfolgt.

Gemäß einer weiteren Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei mindestens einem der deletieren Bereiche im L1- und/oder L2-Protein eines Papillomavirus um N-terminale Aminosäuresequenzen.

Gemäß der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei einer weiteren Ausführungsform bei mindestens einem der deletierten Bereiche im L1-Protein und/oder L2-Protein eines Papillomavirus um Aminosäuresequenzen im mittleren Bereich des Proteins.

Wesentlich für die Erfindung sind ebenfalls Proteine, insbesondere zur Bildung von papillomavirusähnlichen Hybridpartikeln, wobei ein oder mehrere Abschnitte des L1- und/oder L2-Proteins deletiert sind. Insbesondere handelt es

26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646-FR9701412

sich bei mindestens einem der deletierten Bereiche im L1- und/oder L2-Protein um eine Deletion einer C-terminalen Aminosäuresequenz.

Die Fusionsproteine, insbesondere zur Bildung von papillomavirusähnlichen Hybridpartikeln gemäß einer weiteren Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung, bestehen vorteilhafterweise aus einem deletierten L1- und/oder L2-Protein von verschiedenen Papillomaviren, besonders bevorzugt HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 und 45, und anderen Proteinen oder Proteinfragmenten von Papillomaviren oder von anderer Herkunft. Bevorzugt handelt es sich bei diesen anderen Proteinen oder Proteinfragmenten um entsprechende frühe Papillomavirus-Proteine oder Fragmente davon, wie z.B. die frühen Proteine E1, E2, E4, E5, E6 und/oder E7.

Gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren wird zur Expression der Proteine und/oder Fusionsproteine und Produktion von papillomavirusähnlichen Partikeln in viralen, eukaryotischen oder prokaryotischen Vektoren, ganz besonders bevorzugt in Vaccinia-Rekombinanten, in Baculoviren, in Hefen oder in Bakterien, insbesondere in E. coli, durchgeführt.

Bevorzugt erfolgt die Partikelproduktion im Zytoplasma. Die Partikel werden besonders bevorzugt in den Überstand sezerniert, ganz besonders bevorzugt werden ungefähr 5 bis 10 % der Partikel in den Überstand sezerniert.

Insbesondere wird gemäß der vorliegenden Erfindung durch Einfügen einer 26 Aminosäure (AS) großen, C-terminalen Deletion in der Nucleotidposition 7016-7093 in das L1 ORF des bovinen Papillomavirus Typ 1 (BPV 1) die Produktion von VLPs um das mehr als 10-fache gesteigert. So läßt sich bei gleicher Menge an L1-Protein, wie z.B. in einem Western Blot demonstrierbar, eine Steigerung der Partikelzahl im Elektronenmikroskop zeigen. Da die Deletion bevorzugt das

15 26-07-2002

Printed 30-07-2002 ODOC 97935646-FR9701412

nukleäre Lokalisationssignal (NLS) umfaßt, erfolgt die Partikelproduktion im Zytoplasma, ein erheblicher Teil der Partikel wird in den Überstand sezerniert. Dies ist besonders vorteilhaft, da hierdurch die Reinigung wesentlich erleichtert wird.

Proteine, bevorzugt mit genannter Deletion mit zusätzlichen 6 Histidinen (His-L1-Proteine) werden gemäß der vorliegenden Erfindung in E. coli exprimiert. Die Proteine, insbesondere His-L1-Proteine, werden bevorzugt über Ni-Affinitäts-chromatograpie gereinigt, wobei die Proteine entsprechend einer vorteilhaften Ausführungsform zu diesem Zeitpunkt in Denaturierungspuffer, beispielsweise 6 M Guanidinhydrochlorid, vorliegen. Die Renaturierung erfolgt beispielsweise in 150 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 0,01 % Triton-X 100, 10 mM Hepes (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonsäure), pH 7,4.

Die Produktion (Assembly) der VLP erfolgt gemäß einer bevorzugten Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung nach Dialyse der Proteine, vorteilhafterweise nach Dialyse gegen 150 mM NaCl, 25 mM Ca^{2+}, 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid), 0,1 % Triton-X 100, 10 mM Tris [tris-(hydroxymethyl)aminomethan] Essigsäure bei einem pH-Wert von 5,0.

Die Deletion von Sequenzen im L1-Protein von sämtlichen Papillomaviren, die das vorzeitige Assembly der VLPs verhindern, führt zu einer höheren Ausbeute bei der VLP Produktion.

Sofern in diesen Fällen das L1 NLS betroffen ist, erfolgt die Assembly im Zytoplasma. Somit ist die Reinigung des VLPs erfindungsgemäß aus dem Zytoplasma, statt wie bisher aus dem Zellkern, möglich. Erfindungsgemäß sind auch kürzere Deletionen möglich. Gemäß der vorliegenden Erfindung werden Deletionen bis zu einer Aminosäure und/oder Substitutionen

26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646-FR970141 2

von bis zu einer Aminosäure durchgeführt. Hierbei erweist es sich als vorteilhaft, daß bei kurzen Deletionen bzw. bei Substitutionen von bis zu einer bzw. nur weniger Aminosäuren die antigenen Eigenschaften der Proteine und der sich daraus gebildeten VLPs so wenig wie möglich gegenüber der nativen antigenen Eigenschaft der Proteine bzw. VLPs verändert sind.

Die Einführung einer wie vorgehend ausgeführten C-terminalen Deletion bzw. Substitution in L1- und/oder L2-Fusionsproteine, führt auch zu einer Steigerung der Produktion von Hybrid VLPs. Hierbei sollen auch die VLPs eingeschlossen sein, die nur L1-Fusionsproteine enthalten, sowie Hybrid VLPs, die ein L1- bzw. L2-Fusionsprotein und ein L2- bzw. L1-Protein enthalten.

Hierzu werden VLP´s hergestellt, die aus Fusionsproteinen von späten und frühen HPV-Proteinen (oder Fragmenten davon) ("HVLP") bestehen und für prophylaktische bzw. therapeutische Impfung einsetzbar sind. Ein solcher Impfstoff besitzt gegenüber konventionellen Präparaten die im folgenden beschriebenen Vorteile:

a) Im Falle von prophylaktischer Impfung verhindern HVLP´s durch Induktion L1/L2-spezifischer Antikörper nicht nur den Eintritt des Virus in die Zelle, sondern eliminieren bereits infizierte Zellen (durch Induktion von zytotoxischen T-Zellen), falls schon früher eine Infektion stattgefunden hat oder die humorale Immunantwort nicht ausreichend war.

b) Im Falle von therapeutischer Impfung eliminieren HVLP´s persistent infizierte Zellen (z.B. bei Patienten mit CIN oder Cervixcarcinom), und verhindern vor allem bei Patientinnen mit CIN-Läsionen eine Reinfektion.

26-07-2002

Printed:30.07.2002 ODOC 97935646.FR970141.2

c) Die Reinigung der HVLP´s ist ähnlich einfach wie die der VLP´s ohne frühe HPV-Proteine.

VLP´s des Bovinen Papillomavirus (BPV) Typ 1 und der humanen Papillomaviren 11 und 16 können nach Expression von L1 plus L2 bzw. von L1 allein in Vaccinia oder Baculovirus hergestellt werden. Experimente zeigen, daß Teile des L1-Proteins deletiert werden können (Aminosäuresequenz 311-351, 331-371, 391-431 von BPV 1; 306-315 von HPV 16), ohne daß die Fähigkeit zur Bildung von VLP´s verloren geht. Solche Bereiche existieren in den L1-Proteinen aller Papillomaviren, so daß der deletierte Bereich von L1 durch andere Proteine (von Papillomaviren oder von anderem Ursprung) ersetzt werden kann und daß so virusähnliche Hybridpartikel hergestellt werden können. In gleicher Weise werden auch Teile des Papillomavirus-Proteins L2 deletiert und durch andere (frühe HPV oder sonstige) Proteine ersetzt, daß also HVLP´s auch aus dem vollständigen L1-Protein plus einem L2-Fusionsprotein gebildet werden können.

Fusionsproteine bestehend aus deletiertem L1- oder L2-Protein von verschiedenen HPV-Typen (in erster Linie HPV 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45) und den entsprechenden frühen Proteinen E1, E2, E4, E5, E6, E7 (oder Teilen davon) werden durch Expression in Vaccinia-Rekombinanten hergestellt, die in sehr kurzer Zeit konstruiert werden können. Die Bildung von VLPs, bestehend entweder aus einem L1-Fusionsprotein oder aus dem vollständigen L1-Protein plus einem L2-Fusionsprotein, wird durch Elektronenmikroskopie überprüft und das Vorhandensein des frühen HPV-Proteins durch Western Blot Analyse mit Hilfe spezifischer Antiseren getestet. Für die Produktion von HPLV´s im großen Maßstab wird die Expression der Proteine in viralen eukaryotischen oder prokaryotischen Systemen, bevorzugt in Baculovirus, in Hefe, oder in E. coli durchgeführt.

26.07.2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646-FR9701412

Die Anwendung der Fusionsproteine oder der virusähnlichen Hybridpartikel zur Herstellung eines prophylaktischen und therapeutischen Impfstoffs erfolgt gemäß der vorliegenden Erfindung bevorzugt nach Zugabe weiterer Komponenten.

Entsprechende Experimente zur Herstellung von Fusionsproteinen können mit Proteinen anderen Ursprungs durchgeführt werden.

19 26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646.FR970412

Patentansprüche

1. Rekombinant hergestellte papillomavirusähnliche Partikel, die nach Expression der viralen Strukturproteine L1 und/oder L2 entstehen, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Abschnitte des L1- und/oder L2-Proteins deletiert sind, wobei die Fähigkeit zur Bildung von virusähnlichen Partikeln bestehen bleibt.

2. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den deletierten Bereichen im L1-Protein um die Aminosäuresequenzen 311-351, 331-371, 391-431 des Bovinen Papillomavirus Typ 1 handelt.

3. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den deletierten Bereichen im L1-Protein um die Aminosäuresequenz 306-315 des humanen Papillomavirus 16 handelt.

4. Virusähnliche Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der deletierte Bereich von L1- und/oder L2-Proteinen durch andere Proteine oder Proteinfragmente ersetzt ist, um ein Fusionsprotein zu erhalten.

5. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil an L1- bzw. L2-Protein ca. 50 bis 99 %, bevorzugt ca. 60 bis 90 %, besonders bevorzugt ca. 80 % des Fusionsproteins beträgt.

6. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß der deletierte Bereich im L1- oder L2-Protein durch andere Proteine von Papillomaviren und/oder Proteinen anderen Ursprungs

20 26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646-FR970412

ersetzt ist, wodurch virusähnliche Hybridpartikel herstellbar sind.

7. Virusähnliche Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Bildung der virusähnlichen Partikel aus einem L1-Fusionsprotein oder einem vollständigen L1-Protein und einem L2-Fusionsprotein erfolgt.

8. Fusionsproteine, insbesondere zur Bildung von papillomavirusähnlichen Hybridpartikeln nach einem der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Fusionsproteine aus einem deletierten L1- und/oder L2-Protein von verschiedenen HPV-Typen und andere Proteine oder Fragmente davon umfassen.

9. Fusionsprotein nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die anderen Proteine oder Fragmente frühe Proteine oder Fragmente sind.

10. Fusionsprotein nach Anspruch 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um die frühen Proteine E1, E2, E4, E5, E6, E7 oder um Fragmente davon handelt.

11. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um deletierte L1- und/oder L2-Proteine von verschiedenen HPV-Typen wie HPV 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45 ndelt.

12. Rekombinant hergestellte papillomavirusähnliche Partikel, die nach Expression der viralen Strukturproteine L1 und/oder L2 entstehen,

dadurch gekennzeichnet,

21 26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646 FR970412

daß ein oder mehrere Abschnitte des L1- und/oder L2-Proteins deletiert sind, wobei die Fähigkeit zur Bildung von virusähnlichen Partikeln im Vergleich zur nativen Bildung und/oder in vitro Produktion erhöht ist.

13. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei mindestens einem der deletierten Bereiche im L1- und/oder L2-Protein eines Papillomavirus um C-terminale Aminosäuresequenzen handelt.

14. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem mindestens einen deletierten Abschnitt im C-terminalen Bereich im L1- und/oder L2-Protein um eine Aminosäuresequenz in einer Länge von ungefähr 1 bis 34 Aminosäuren, bevorzugt 1 bis 26 Aminosäuren, eines Papillomavirus handelt.

15. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß nach Einfügen insbesondere der C-terminalen Deletion in das L1- und/oder L2-Protein die Produktion von VLPs um ein Vielfaches, bevorzugt um das mindestens 10-fache, besonders bevorzugt um das ca. 10- bis 100-fache, gesteigert wird.

16. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den deletierten Bereichen im L1- und/oder L2-Protein um 26 C-terminale Aminosäuren des Bovinen Papillomavirus handelt.

17. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die 26 AS große, C-terminale

22 26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646:FR9701412

Deletion (Gly-Ala-Gly-Cys-Ser-Thr-Val-Arg-Lys-Arg-Arg-Ile-Ser-Gln-Lys-Thr-Ser-Ser-Lys-Pro-Ala-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys) entsprechend der Nucleotid-Position 7016 bis 7093 GGGGCAGGAT GTTCAACTGT GAGAAAACGA AGAATTAGCC AAAAAACTTC CAGTAAGCCT GCAAAAAAAA AAAAAAAA, in das L1 ORF des Bovinen Papillomavirus Typ 1 eingefügt ist.

18. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den deletierten Bereichen im L1- und/oder L2-Protein um 34 C-terminale Aminosäuren des humanen Papillomavirus Typ 16 (HPV 16) handelt.

19. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die 34 AS große, C-terminale Deletion (Ala-Gly-Leu-Lys-Ala-Lys-Pro-Lys-Phe-Thr-Leu-Gly-Lys-Arg-Lys-Ala-Thr-Pro-Thr-Thr-Ser-Ser-Thr-Ser-Thr-Thr-Ala-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Leu) entsprechend der Nucleotid-Position 7052 bis 7153 GCAGGATTGA AGGCCAAACC AAAATTTACA TTAGGAAAAC GAAAAGCTAC ACCCACCACC TCATCTACCT CTACAACTGC TAAACGCAAA AAACGTAAGC TG in das L1 ORF des Humanen Papillomavirus Typ 16 (HPV 16) eingefügt ist.

20. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der mindestens einen Deletion im C-terminalen Bereich im L1- und/oder L2-Protein um eine homologe Aminosäuresequenz des humanen Papillomavirus 16 oder anderer Papillomaviren handelt.

21. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Deletion des L1- und/oder L2-Proteins das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) umfaßt.

26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646-FR9701412

22. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelproduktion aus den L1-Proteinen oder L1- und L2-Proteinen im Zytoplasma erfolgt.

23. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß Partikel in den Überstand sezerniert werden.

24. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß ca. 5 bis 10 % der Partikel in den Überstand sezerniert werden.

25. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression von L1-Proteinen oder L1- und L2-Proteinen in E. coli erfolgt.

26. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß an der C-terminalen Deletion im L1 Protein 6 Histidine eingefügt wurden.

27. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 25 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Herstellung von VLPs nach Expression von L1-Proteinen oder L1- und L2-Proteinen in E. coli erfolgt.

28. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den weiteren deletierten Bereichen im L1-Protein um die Aminosäuresequenzen 311-351, 331-371, 391-431 des Bovinen Papillomavirus Typ 1 handelt.

29. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den weiteren deletierten Bereichen im L1-Protein um die

24 26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646 FR970412

Aminosäuresequenz 306-315 des humanen Papillomavirus 16 handelt.

30. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß der deletierte Bereich von L1- und/oder L2-Proteinen durch andere Proteine oder Proteinfragmente ersetzt ist, um ein Fusionsprotein zu erhalten.

31. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil an L1- bzw. L2-Protein ca. 50 bis 99 %, bevorzugt ca. 60 bis 90 %, besonders bevorzugt ca. 80 % des Fusionsproteins beträgt.

32. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 30 und 31, dadurch gekennzeichnet, daß der deletierte Bereich im L1- oder L2-Protein durch andere Proteine von Papillomaviren und/oder Proteinen anderen Ursprungs ersetzt ist, wodurch virusähnliche Hybridpartikel herstellbar sind.

33. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Bildung der virusähnlichen Partikel aus einem L1-Protein, einem L1-Fusionsprotein, einem L1-Protein und L2-Protein, einem L1-Fusionsprotein und L2-Protein, einem L1-Protein und einem L2-Fusionsprotein oder einem L1-Fusionsprotein und einem L2-Fusionsprotein erfolgt.

34. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei mindestens einem der deletierten Bereiche im L1- und/oder L2-Protein eines Papillomavirus um N-terminale Aminosäuresequenzen handelt.

26-07-2002

Printed:30-07-2002 EDOC 97935646-FR9701412

35. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei mindestens einem der deletierten Bereiche im L1- und/oder L2-Protein eines Papillomavirus um Aminosäuresequenzen im mittleren Bereich des Proteins handelt.

36. Proteine, insbesondere zur Bildung von papillomavirusähnlichen Hybridpartikeln gemäß einem der Ansprüche 12 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Abschnitte des L1- und/oder L2-Proteins deletiert sind.

37. Proteine nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei mindestens einem der deletierten Bereiche im L1- und/oder L2-Protein um eine Deletion einer C-terminalen Aminosäuresequenz handelt.

38. Fusionsproteine, insbesondere zur Bildung von papillomavirusähnlichen Hybridpartikeln nach einem der Ansprüche 12 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß die Fusionsproteine deletierte L1- und/oder L2-Proteine von verschiedenen Papillomaviren und andere Proteine oder Fragmente von Papillomaviren oder anderer Herkunft enthalten.

39. Fusionsprotein nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß die anderen Proteine oder Fragmente frühe Papillomavirus-Proteine oder Fragmente davon sind.

40. Fusionsprotein nach Anspruch 38 oder 39, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um die frühen Proteine E1, E2, E4, E5, E6, E7 oder um Fragmente davon handelt.

26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646:FR9701412

41. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 38 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um deletierte L1- und/oder L2-Proteine von verschiedenen HPV-Typen wie HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 45 handelt.

42. Verfahren zur Expression der Fusionsproteine gemäß einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Proteine und Fusionsproteine in viralen oder in eukaryotischen Vektoren durchgeführt wird.

43. Verfahren zur Expression der Proteine und/oder Fusionsproteine und Produktion von papillomavirusähnlichen Partikeln gemäß einem der Ansprüche 12 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Proteine und Fusionsproteine in viralen, eukaryotischen oder prokaryotischen Vektoren durchgeführt wird.

44. Verfahren nach einem der Ansprüche 42 oder 43, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine oder Fusionsproteine durch Expression in Vaccinia-Rekombinanten hergestellt werden.

45. Verfahren nach einem der Ansprüche 42 oder 43, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Proteine und Fusionsproteine in Baculoviren oder in Hefen durchgeführt wird.

46. Verfahren nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Proteine und Fusionsproteine in E. coli durchgeführt wird.

47. Verfahren nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, daß die Reinigung, insbesondere der L1-Proteine, durch Ni-Affinitätschromatographie und Renaturierung,

26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97935646-FR9701412

bevorzugt in 150 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 0,01 % Triton-X 100, 10 mM Hepes pH 7,4, erfolgt.

48. Verfahren nach Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine zum Zeitpunkt der Reinigung in Denaturierungspuffer vorliegen.

49. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Denaturierungspuffer um 6 M Guanidinhydrochlorid handelt.

50. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 49, dadurch gekennzeichnet, daß das Assembly der VLPs nach Dialyse erfolgt.

51. Verfahren nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, daß die Dialyse gegen 150 mM NaCl, 25 mM Ca^{2+}, 10% DMSO, 0,1% Triton-X 100 und 10 mM Tris Essigsäure bei pH = 5,0 erfolgt.

52. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 51, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelproduktion im Zytoplasma erfolgt.

53. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 52, dadurch gekennzeichnet, daß Partikel in den Überstand sezerniert werden.

54. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, daß ungefähr 5 bis 10% der Partikel in den Überstand sezerniert werden.

55. Verwendung der Proteine und/oder Fusionsproteine gemäß einem der Ansprüche 8 bis 11 oder 36 bis 41 zur Herstellung eines Impfstoffs zur prophylaktischen

26-07-2002

Printed:30-07-2002 ODOC 97985646-FR9701412

und/oder therapeutischen Impfung, bevorzugt nach Zugabe weiterer Komponenten.

56. Verwendung der virusähnlichen Hybridpartikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 12 bis 35 zur Herstellung eines Impfstoffs zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Impfung, bevorzugt nach Zugabe weiterer Komponenten.

26-07-200